

## グルコサミン類が骨芽細胞の細胞増殖・破骨細胞の分化に与える影響

清水達夫, 中谷祥恵, 古旗賢二, 和田政裕

城西大学 大学院 薬学研究科

〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台1番1号

### Effect of glucosamine on osteoblast cell proliferation and osteoclast differentiation

Tatsuo SHIMIZU, Sachie NAKATANI, Kenji KOBATA, and Masahiro WADA

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Josai University*

*Keyakidai 1-1 Sakado, Saitama 350-0295, Japan*

2012年1月27日 受理

*N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) is one of the important structural component of the extracellular matrix (ECM). Currently, health foods containing GlcNAc and D-glucosamine hydrochloride (GlcN · HCl) are consumed in order to facilitate the synthesis of the ECM in the cartilage. We have reported that oral administration of GlcNAc and GlcN · HCl increases bone mineral density of the long bones in mice, and that the effects are caused through the regulation of gene expression for the bone metabolism. In this study, we report the effect on GlcNAc and GlcN · HCl cell growth and differentiation of osteoblasts and osteoclasts.

**Keywords:** GlcNAc, GlcN, osteoblast, osteoclast

#### 1. はじめに

*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) および D-グルコサミン (GlcN) は、細胞外基質を構成するヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などグリコサミノグリカン (GAG) の基本構成糖である。GlcN は、Glucose transporter 2 (GLUT2) を介して細胞内に取り込まれ<sup>1)</sup>、GlcNAc に代謝されてヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸などの GAG になることが報告されている<sup>2)</sup>。そのため、摂取された GlcNAc および GlcN が GAG の構成糖となり得ると考えられ、関節機能の改善を目的とした健康食品として利用されている。

一方、最近の研究で GlcNAc および GlcN がタンパク質の翻訳後修飾などに関与することで、様々なシグナル伝達を調節することが示唆されている<sup>3)</sup>。シグナル伝達の調節については、GlcN が p38MAPK のリン酸化を抑制することが滑膜細胞を用いた実験で報告されている<sup>4)</sup>。また、GlcN が mRNA 発現レベルの調節を介して前駆軟骨細胞株 ATDC5 の石灰化を抑制することが明らかになっている<sup>5)</sup>。GlcN および GlcNAc が破骨細胞の活性化に関わる Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) の mRNA 発現レベルを抑制することで、骨吸収を抑制する可能性がマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた実験で報告されている<sup>6)</sup>。これらの結果は、

GlcNAc および GlcN の摂取は関節軟骨の GAG の構成糖としての働きだけでなく、滑膜や関節軟骨以外の代謝にも遺伝子発現調節を介し働く可能性があることを示唆している。

我々はこれまでに、GlcNAc および GlcN の摂取がマウス長管骨において骨形成を促進し、骨吸収を抑制することで骨密度を増加させることを報告した<sup>7,8)</sup>。またその作用として transforming growth factor, beta (TGF- $\beta$ ) の上流および下流の遺伝子調節を介する可能性があること報告した<sup>7)</sup>。これらのことは、GlcNAc および GlcN が遺伝子調節を介して骨芽細胞および破骨細胞に作用していると考えられたが、GlcNAc および GlcN が骨芽細胞および破骨細胞それぞれに与える影響についてはあまり研究が行われていない。そこで本稿では、GlcNAc および GlcN が骨芽細胞の細胞増殖および細胞毒性に与える影響について、また破骨細胞の分化、融合に与える影響について検討をした。

## 2. GlcNAc, GlcN が骨芽細胞の増殖に与える影響

生後1日目の C57BL/6J マウスの頭蓋冠をコラゲナーゼ処理し頭蓋冠由来骨芽細胞を得た。マウス頭蓋冠由来骨芽細胞における GlcNAc (N-Acetyl-D-glucosamine, SIGMA) または GlcN · HCl (D-(+)-Glucosamine hydrochloride, SIGMA) の細胞増殖に与える影響について WST-1 法を用いて調べた。

その結果、GlcNAc の添加は、骨芽細胞の増殖に影響を与えなかった (図 1A)。一方、GlcN · HCl の添加は 0.01-1mM において骨芽細胞の増殖に影響を与えなかった。5mM, 10mM の高濃度の GlcN · HCl 添加では、細胞毒性があると考え

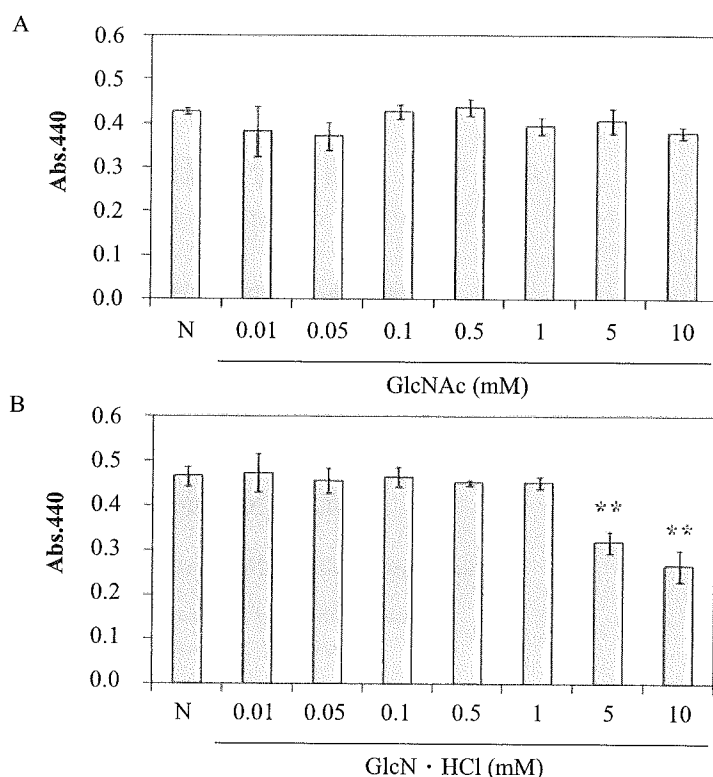


図1 GlcNAc および GlcN · HCl が骨芽細胞の細胞増殖に与える影響

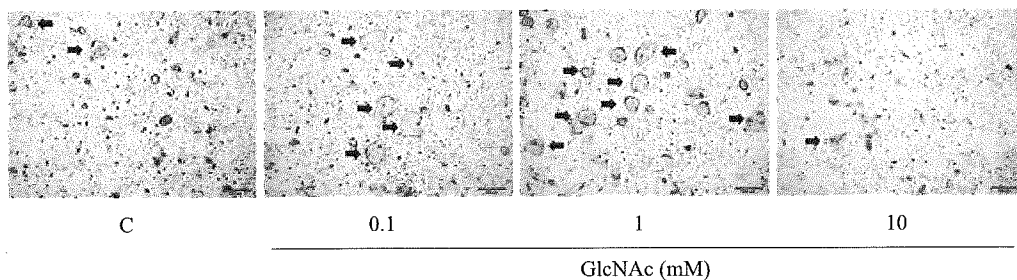
(A) GlcNAc (B) GlcN · HCl

Each bar is the mean  $\pm$  S.D, n=6. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. normal (N) using Dunnett's  $t$  test.

られる (図 1B)。

GlcNAc および 0.01-1mM GlcN · HCl は骨芽細胞の増殖に影響を与えなかったことから、マウス長管骨の骨密度の増加は、骨芽細胞の増殖ではなく骨芽細胞の分化および石灰化を調節している可能性が考えられた。今後、GlcNAc および GlcN が骨芽細胞の分化および石灰化に与える影響について検討を行う必要がある。また遺伝子調節を介して骨代謝を調節している可能性があることから GlcNAc および GlcN が骨芽細胞の mRNA 発現レベルに与える影響について検討を行う必要がある。GlcN · HCl で細胞増殖が抑制されたのは、添加した濃度が高いためだと考えられた。また、GlcNAc と GlcN では細胞への取り込み効率の違いなど細胞に対する作用の違いがある可能性がある。

A



B

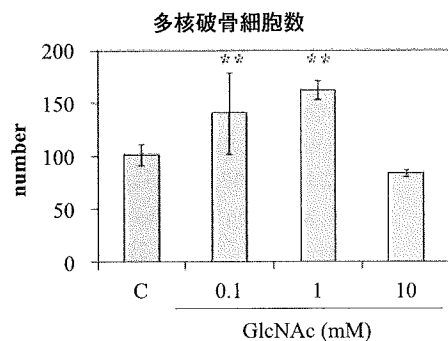
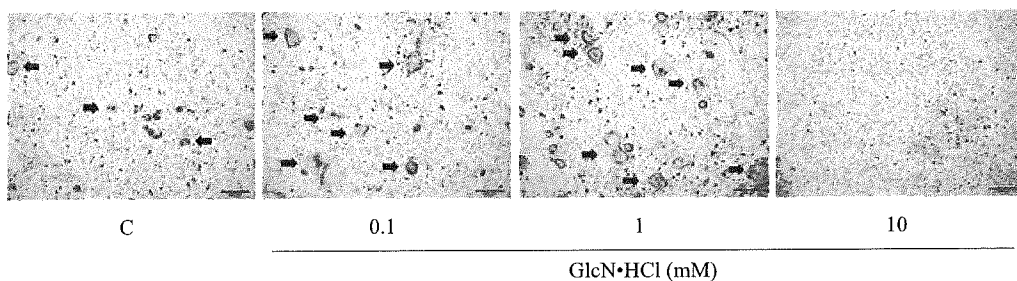


図2 GlcNAc が破骨細胞に与える影響

Each bar is the mean  $\pm$  S.D, n=6. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. control (C) using Dunnett's  $t$  test.

A



B

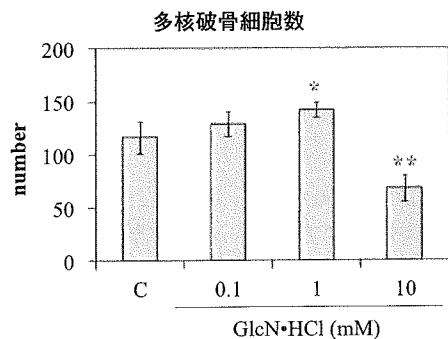


図3 GlcN · HCl が破骨細胞に与える影響

Each bar is the mean  $\pm$  S.D, n=6. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. control (C) using Dunnett's  $t$  test.

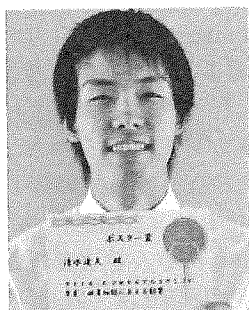
### 3. GlcNAc, GlcN が破骨細胞に与える影響

破骨細胞は、造血幹細胞から分化する細胞である。造血幹細胞は macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) と破骨細胞の形成と活性化に関与する RANKL の刺激により破骨細胞に分化する。そこで、GlcNAc および GlcN が破骨細胞への分化および融合に与える影響について検討するために 8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスの大腿骨および脛骨から骨髓細胞を初代培養し M-CSF および RANKL 存在下で培養し、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 陽性の多核細胞を破骨細胞数とし TARP 染色を行い評価した。その結果, 0.1mM, 1mM GlcNAc 添加で破骨細胞数が増加した (図 2)。GlcN・HCl では, 1mM で破骨細胞数が増加し, 10mM で破骨細胞数が減少した (図 3)。したがって GlcNAc および GlcN・HCl は, 破骨細胞への分化を促進させる可能性がある。一方, 10mM の GlcNAc および GlcN・HCl の添加では破骨細胞への分化を抑制させる可能性がある。しかしながら, 破骨細胞数が増加する結果は, マウス長管骨の骨形態計測において GlcNAc および GlcN・HCl が破骨細胞数を減少させる結果<sup>8)</sup>と異なる。そのため生体内と培養細胞で GlcNAc および GlcN の作用が異なる可能性がある。また, 破骨細胞の活性化は骨芽細胞との相互作用も関わっ

ていることから骨芽細胞に GlcNAc および GlcN が作用し破骨細胞の分化を調節している可能性がある。そのことは骨芽細胞が発現する RANKL の mRNA 発現レベルを GlcNAc および GlcN が抑制すること<sup>6)</sup>からも骨芽細胞を介して破骨細胞への分化を GlcNAc および GlcN が調節していることが示唆される。したがって骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に与える影響について検討するために, より生体に近い培養方法である骨芽細胞と破骨細胞の共培養系を用いて今後検討を行う必要がある。

#### Reference

- 1) M.Uldry, M.Ibberson, M.Hosokawa, B. Thorens : *FEBS Lett*, **135**, 199-203 (2002).
- 2) J.W.Anderson, R.J.Nicolosi, J.F.Borzelleca : *Food Chem Toxicol*, **43**, 187-201 (2005).
- 3) Kudlow,J.E. : *J Cell Biochem*, **98**, 1062-75 (2006).
- 4) J.Hua, K.Sakamoto, T.Kikukawa, C.Abe, H.Kurosawa, I.Nagaoka : *Inflamm Res*, **56**, 432-438 (2007).
- 5) S.Nakatani, H.Mano, R.Im, J.Shimizu, M.Wada : *Biol Pharm Bull*, **30**, 433-438 (2007)
- 6) M.Igarashi, K.Sakamoto, I.Nagaoka : *Int J Mol Med*, **28**, 373-379 (2011)
- 7) T.Shimizu, S.Nakatani, K.Kobata, M.Wada : *Chitin Chitosan Res*, **17**, 74-78 (2011)
- 8) S.Nakatani, T.Shimizu, K.Kobata, M.Wada : *Glucosamine Res*, **7**, 51-56 (2011).



清水 達夫 (Tatsuo SHIMIZU)

平成 22 年 3 月 城西大学 薬学部 薬科学科 卒業  
平成 22 年 4 月 城西大学大学院 薬学研究科 薬科学専攻 入学  
平成 23 年 8 月 第 25 回キチン・キトサンシンポジウム ポスター賞受賞